

ニッポンハム食の未来財団 2019 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	血清 microRNA を用いた好酸球性食道炎の新規バイオマーカーの確立
フリガナ	オオシマ ナオキ
代表者名	大嶋 直樹
所属機関 (機関名) (役職名)	国立病院機構 浜田医療センター 消化器内科 医長
本助成金による 発表論文, 学会発表	2019/06 第 97 回日本消化器内視鏡学会 ワークショップ 7: 消化器内視鏡診療におけるトランスレーショナルリサーチ 「microRNA の網羅的解析を用いた好酸球性食道炎のバイオマーカーの探索」

研究結果要約

好酸球性食道炎 (EoE) は遅延型食物アレルギーの一つであり、食道粘膜に多数の好酸球が浸潤し慢性炎症が惹起される病態である。近年、患者数は急激に増加傾向であるが、診断、治療に関しては未だ確立されていない部分が多い。これまでに、我々は食道粘膜局所における microRNA (miRNA) に着目し、内視鏡下に生検した食道粘膜の網羅的解析を行うことによって、欧米との発現プロファイルの相違やどのように病態形成に関与しているのかを明らかにしてきた。

そこで、本研究では未治療の EoE 患者を対象に、血清 miRNA 発現を網羅的に解析し、非侵襲的なバイオマーカーになり得るのかを検討した。その結果、粘膜局所と同様に血清においても EoE 患者とコントロールの間で明確な miRNA 発現パターンの相違を認め、miRNA の発現プロファイルも極めて欧米と類似していることが明らかになった。これは EoE の病態は、本邦と欧米で人種差はなく同一の機序である可能性を示すものであった。加えて、特定の miRNA は EoE の診断や治療にお

ける非侵襲的なバイオマーカーの候補となり得るものであった。しかしながら、食道粘膜での miRNA 発現プロファイルとの類似性は認めなかった。以上の結果から、本研究により EoE 患者における血清 miRNA 発現の意義を示すことができた。

研究目的

好酸球性消化管疾患（EGID）は遅延型食物アレルギーの一つであり、消化管に多数の好酸球が浸潤し、慢性炎症が起こる病態である。食道のみに病変が存在するものを好酸球性食道炎（EoE）、胃や腸管に主に病変を認めるものを好酸球性胃腸炎（EGE）と分類し、いずれも病態形成に食物アレルギーが大きく関与している。

EGID、特に EGE は治療によって一時的に緩解状態となっても、その後高頻度に再発を繰り返す難治性の疾患であるが、診断方法、治療に関しては未だ確立されていない部分も多い¹⁾。我々は日本で最初の EoE 症例を発見して以来、一貫して成人の EGID の研究を遂行しており、すでに多数のエビデンスを報告している²⁻⁴⁾。その中で、EoE 患者の食道粘膜を材料としてマイクロアレイ解析を行い、Th2 系サイトカイン、好酸球ケモカインなどの mRNA 発現のプロファイルが欧米と極めて類似していることを明らかにした⁵⁾。これらは、日本と欧米の EoE の病態がほぼ同一であることを示唆しているが、疾患活動性や治療効果予測のバイオマーカーにはなり得るものではなく、さらなる探索が必要と考えられる。

microRNA（miRNA）は 20 塩基前後の一本鎖 RNA であり、標的とする mRNA に結合して蛋白質の翻訳を抑制し、生体内で重要な役割を果たしている。ヒトでは 1000 種類以上の miRNA の存在が推測されており、種々の疾患に関与することが報告されている。最近、他のアレルギー疾患において血清 miRNA が病態形成のバイオマーカーになる事が示唆されているが、EGID の消化管粘膜における miRNA 発現に着目した研究は欧米においても皆無に等しい。そこで我々は、EGID 患者の消化管局所、または血中における miRNA プロファイルを探索し、どのように病態形成に関与しているのか、またバイオマーカーになり得るのかを明らかにすることを目的に本研究を行っていく。

研究計画及び研究手法

我々は、先行研究にて未治療の活動期 EoE 患者、コントロールとして未治療の逆流性食道炎(RA)患者を対象に、上部消化管内視鏡下に食道粘膜組織の生検を採取、miRNA を精製し、網羅的 miRNA 発現解析 (対象ヒト miRNA 2588 種類)を行った (平成 29 年度ニッポンハム食の未来財団、個人研究助成)。その結果、既報の mRNA での結果と同様に、EoE と RE の間で粘膜局所において明確な miRNA 発現パターンの相違を認め、また、13miRNA の発現亢進、10miRNA の発現低下を確認した (図 1-3)。さらに数種類の miRNA に関しては、プロトンポンプ阻害剤 (PPI) による治療前後で変化を認め、バイオマーカーの候補となり得る可能性が示された (図 4,5)。

そこで、本研究ではこれらの miRNA プロファイルが EoE 患者の末梢血においても同様の結果を示すのかどうかを確認した。

I. EoE 症例の血清における miRNA 発現の網羅的解析

- ① 浜田医療センター、島根大学医学部付属病院にて診断された活動期の未治療 EoE 患者、コントロールとして未治療の逆流性食道炎 (RA) 患者を対象とした。尚、EoE は厚生労働省班会議で作成された診断基準に従い、内視鏡検査にて食道内に縦走溝、白斑等を認め、食道粘膜の生検にて上皮内に 20 個/HPF 以上の好酸球の浸潤を認めたものを EoE と診断した。
- ② EoE 診断時に、同意取得後に末梢血を採取、血清分離後、凍結保存を行った。患者からは患者情報として年齢、性別、発症時期、症状、食物アレルギー情報、血液検査 (白血球数、好酸球数、CRP、IgE、アレルゲンコンポーネント特異的 IgE)、内視鏡所見、上皮内と粘膜固有層内の好酸球浸潤数、治療反応性に関するデータを集積した。コントロールからも同様の患者情報、血液検査のデータ収集を行った。
- ③ 凍結保存した血清は匿名化を行った後に、委託先であるタカラバイオ株式会社において miRNA 抽出、miRCURY LNA microRNA PCR system を用いた網羅的 miRNA 発現解析を行った。本システムは RNA 誘導体である LNA(Locked Nucleic Acid)をプライマーに用いることで、短鎖

で GC 含有量にばらつきのある miRNA に対しても非常に高い配列特異性と結合親和性を持つため、1 塩基レベルでのミスマッチを検出できる検出感度を実現できる特徴を有している。解析対象パネルは miRNome panel(Human、752 種類)を選択した。

- ④ 両グループ間で発現の異なる miRNA 群を統計学的手法により選択し、疾患特異的な候補となる数種類の miRNA を絞り込んだ。
 - ⑤ 続いて同様の手法を用いて、先行研究にて解析を行った EoE 患者の食道粘膜組織における発現プロファイルと今回の結果を比較検討した。
- 尚、本研究は浜田医療センター、島根大学医学部付属病院において医の倫理委員会の承認を得て行った。

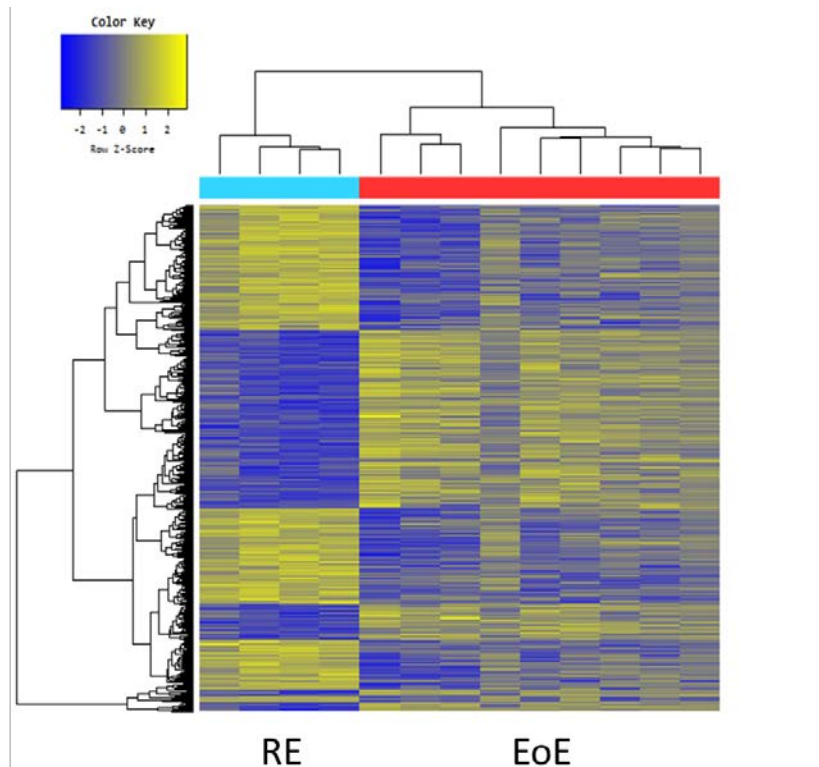


図1: EoE患者とRE患者の食道粘膜におけるmRNA発現の階層型クラスター分析

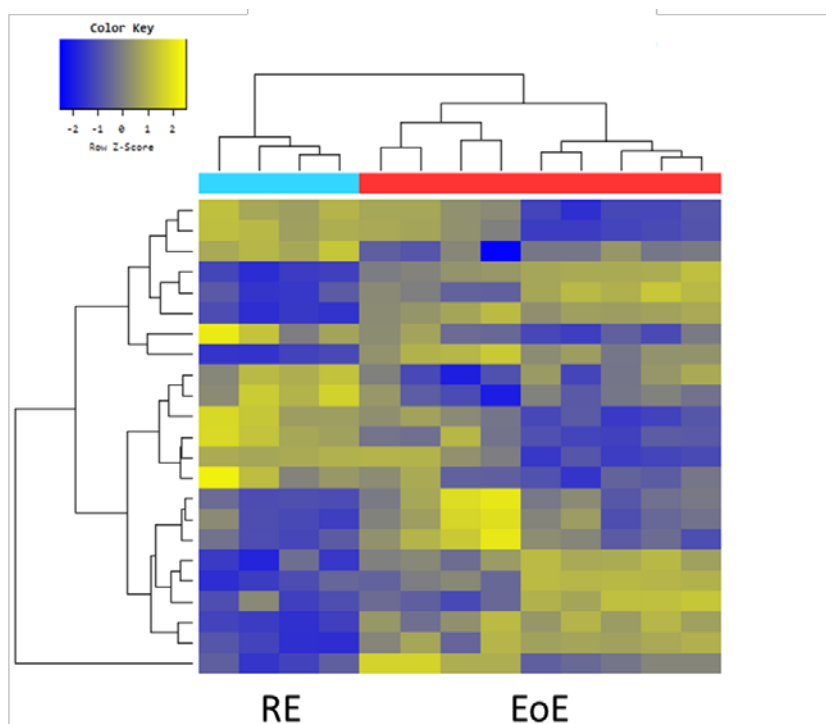


図2: EoE患者とRE患者の食道粘膜におけるmiRNA発現の階層型クラスター分析

発現亢進	発現低下
● hsa-miR-223-3p	● hsa-miR-193b-3p
● hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-6763-5p
● hsa-miR-146a-5p	● hsa-miR-193a-3p
● hsa-miR-142-3p	hsa-miR-210-3p
● hsa-miR-142-5p	hsa-miR-3162-5p
hsa-miR-424-5p	hsa-miR-4721
hsa-miR-483-5p	hsa-miR-4459
hsa-miR-6510-5p	hsa-miR-6746-5p
hsa-miR-619-5p	hsa-miR-6165
● hsa-miR-221-3p	hsa-miR-1225-5p
hsa-miR-3162-3p	
● hsa-miR-21-5p	● : 過去に欧米で報告されているmiRNA
hsa-miR-362-3p	

図3: EoE患者の食道粘膜において発現亢進、低下しているmiRNA

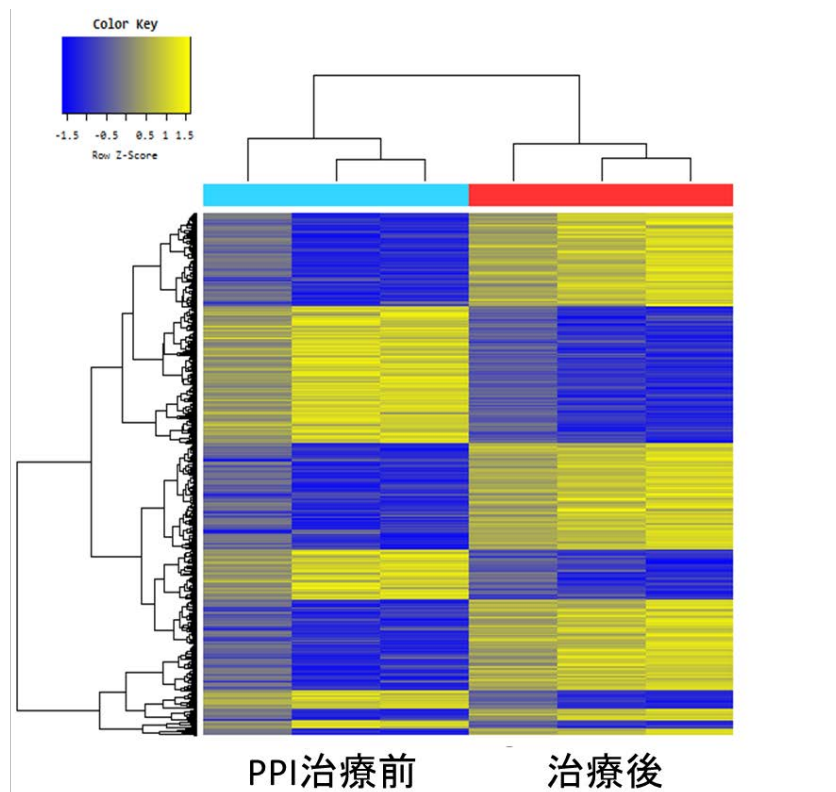


図4: PPI治療前後における食道粘膜のmRNA発現の変化

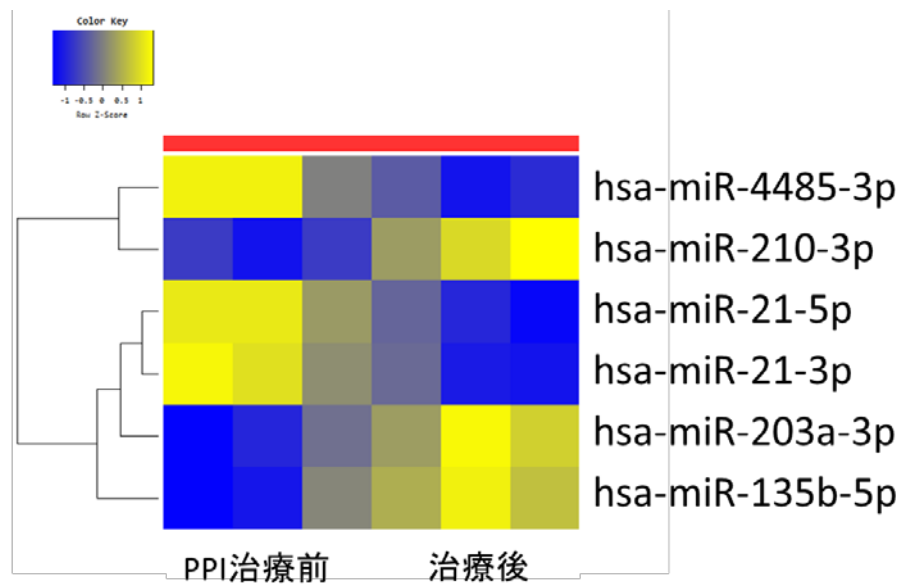


図5: PPI治療前後における食道粘膜のmiRNA発現の変化

発現亢進	発現低下
hsa-miR-1972	hsa-miR-200c-3p
hsa-miR-16-2-3p	● hsa-miR-146b-5p
hsa-miR-654-5p	hsa-miR-664a-3p
hsa-miR-452-3p	hsa-miR-26a-5p
hsa-miR-1468-5p	● hsa-miR-375
hsa-miR-502-3p	● hsa-miR-142-3p
hsa-miR-621	has-miR-380-3p
hsa-miR-877-3p	hsa-miR-192-3p
hsa-miR-146b-3p	hsa-miR-545-3p
	hsa-miR-379-5p
	hsa-miR-340-5p
	hsa-let-7e-5p

●: 過去に欧米で報告されているmiRNA

図6: EoE患者の血清において発現亢進、低下しているmiRNA

結果と考察

I. EoE の患者背景

最終的に浜田医療センター、島根大学医学部附属病院にて本研究に同意の得られた EoE 患者 5 名、コントロール患者 3 名のエントリーを行った。EoE 患者は平均 43.3 歳 (38-50)、男女比 5:0 とこれまでの既報の通り中年層の男性が多かった。また、アレルギー歴は 4 例 (80.0%) に認め、これも欧米の報告と同様に多くの患者がアレルギー歴を有していた。臨床症状は食事のつかえ感、胸やけを約半数に認める一方で、健診や人間ドックで偶発的に指摘された無症候性 EoE も一定の割合で存在する事が明らかになった。内視鏡的所見では EoE に特徴的とされる縦走溝 (食道粘膜に縦走する数条の溝状の陥凹所見) を全例に認め、さらに白斑、浮腫、リングを合併していた。病理組織学的所見では食道粘膜内に平均 53 個 (35-65/HPF) と多数の好酸球の浸潤を認め、EoE の診断基準に矛盾しない結果だった。また、一部の症例では食道基底細胞の過形成や上皮内の好酸球微小膿瘍を認めた。血液学的所見では末梢血の好酸球数は平均 198/ul (110-286) であり、IgE 165.5 (49-218) と上昇

を認めた。

以上の結果はこれまでの報告と同じ傾向であり、EoE の臨床像や内視鏡的、病理学的背景を明確にすることができた。

II. 血清における miRNA 発現の網羅的解析

続いて、同検体を用いて miRCURY LNA microRNA PCR system による網羅的 miRNA 発現解析（対象ヒト miRNA 752 種類）を行った。その結果、EoE とコントロールを比較して 9miRNA の発現亢進、12miRNA の発現低下を認めた（発現亢進：hsa-miR-1972、hsa-miR-16-2-3p、hsa-miR-654-5p、hsa-miR-452-3p、hsa-miR-1468-5p、hsa-miR-502-3p、hsa-miR-621、hsa-miR-877-3p、hsa-miR-146b-3p。発現低下：hsa-miR-200c-3p、hsa-miR-146b-5p、hsa-miR-664a-3p、hsa-miR-26a-5p、hsa-miR-375、hsa-miR-142-3p、hsa-miR-380-3p、hsa-miR-192-3p、hsa-miR-545-3p、hsa-miR-379-5p、hsa-miR-340-5p、hsa-let-7e-5p）（図 6）。

これらの結果をこれまでの欧米の報告で報告された EoE 患者の血清における miRNA 発現と比較すると、発現プロファイルは欧米の報告と一部で類似していた（発現低下：hsa-miR-146b-5p、hsa-miR-375、hsa-miR-142-3p）。一方、我々の先行研究である EoE 患者の食道粘膜局所における miRNA 発現プロファイルと比較するも、食道粘膜と血清で一致している miRNA は認めなかった。

III. 本助成研究の考察

本研究では、未治療の活動期 EoE 患者とアレルギー歴なしのコントロール患者の血清における miRNA 発現プロファイルの比較検討を行った。

その結果、これまでの欧米での報告や先行研究での食道粘膜での miRNA 発現と同様に、コントロール群と比較して有意に発現亢進または低下している数種類の miRNA を指摘し得た。さらに、それらの相違は欧米の報告と一部でオーバーラップしており、EoE 患者における血清 miRNA 発現

プロファイルは人種差を認めないことを裏付ける結果であった。これらの結果により、日本人における EoE の病態は欧米人と同一のものであることが示唆された。

特に欧米でも過去に報告されている has-miR-375 の発現低下は、JAK2 シグナル伝達経路を活性化し、EoE の病態生理に深く関与する Th2 系サイトカインの発現亢進を誘導すると言われており、非常に興味深い結果であった。また、血清バイオマーカーの候補となり得る可能性が示唆された。

一方、我々の先行研究である EoE の食道粘膜における miRNA 発現のプロファイルと今回の結果には類似性は認めなかったが、これは解析対象のサンプルが少なかったこと、または同一症例での解析ではなかったことが原因として挙げられる。今後は、食道、血清ともに同じ患者からのサンプルで解析を試みていきたい。

今後の研究活動について

今回の研究で疾患バイオマーカーの候補として明らかになった数種類の血清 miRNA に関しては、診断、治療効果の予測因子になり得るかどうかを明らかにしていきたい。

今後も日本で最多の成人 EGID 患者の診療実績を生かして、EGID の臨床サンプル、特に内視鏡下で得た消化管の生検材料や血液サンプルを用いた臨床研究を推進し、本邦の食物アレルギー研究の一端を担いたいと思っている。

参考文献

- 1) Petitti DB, Crooks VC, Buckwalter JG, Chiu V. Blood pressure levels before dementia. Arch Neurol. 2005 Jan;62(1):112-6.
- 1) Kinoshita Y, Furuta K, Ishimura N, Ishihara S, Sato S, Maruyama R, Ohara S, Matsumoto T, Sakamoto C, Matsui T, Ishikawa S, Chiba T. Clinical characteristics of Japanese patients with eosinophilic esophagitis and eosinophilic gastroenteritis. J Gastroenterol. 2013 Mar;48(3):333-9.
- 2) Okimoto E, Ishimura N, Oshima N, Ishihara S, Kinoshita Y. Locations of linear furrows in patients with esophageal eosinophilia. Dig Endosc. 2016 Aug 4.
- 3) Jiao D, Ishimura N, Oshima N, Kinoshita Y. Similarities and differences among eosinophilic

esophagitis, proton-pump inhibitor-responsive esophageal eosinophilia, and reflux esophagitis: comparisons of clinical, endoscopic, and histopathological findings in Japanese patients. *J Gastroenterol*. 2016 Apr 23.

- 4) Oshima N, Ishihara S, Ishimura N, Kinoshita Y. Epidermal differentiation complex protein involucrin is down-regulated in eosinophilic esophagitis. *Esophagus*. 2017;14(3):171-177.
- 5) Shoda T, Morita H, Nomura I, Ishimura N, Ishihara S, Matsuda A, Matsumoto K, Kinoshita Y. Comparison of gene expression profiles in eosinophilic esophagitis (EoE) between Japan and Western countries. *Allergol Int*. 2015 Jul;64(3):260-5.

以上